

# 雪上一枝蒿总生物碱微乳的研制与质量评价

吴玉梅<sup>1</sup>, 陈晓兰<sup>1\*</sup>, 林亚平<sup>2</sup>, 刘文<sup>1</sup>, 唐红艳<sup>1</sup>, 戴雅洁<sup>1</sup>

(1. 贵阳中医学院药学院, 贵阳 550002; 2. 贵州省食品药品监督管理局, 贵阳 550003)

**[摘要]** 目的: 制备质量稳定的雪上一枝蒿总生物碱微乳, 为该制剂的深入研究与开发提供参考。方法: 选用不同的油相、乳化剂及助乳化剂, 采用伪三元相图法进行雪上一枝蒿总生物碱微乳的处方筛选与制备, 考察该制剂的稳定性及理化性质。采用 HPLC 测定雪上一枝蒿甲素的含量, 流动相乙腈-pH 7.3 磷酸盐缓冲溶液(20:80), 检测波长 199 nm。结果: 雪上一枝蒿总生物碱微乳最佳配比为雪上一枝蒿总生物碱、肉豆蔻酸异丙酯、聚氧乙烯 35 蓖麻油、无水乙醇、水质量分数分别为 2%、3.3%、19.8%、9.9%、65.0%。载药微乳澄清透明, 呈圆球形, 粒径均在 10~100 nm。于 4、25 °C 下放置 6 个月内质量稳定。雪上一枝蒿甲素的质量分数 2.28 mg·g<sup>-1</sup>。结论: 优化的雪上一枝蒿总生物碱微乳处方达到了预期的要求, 为该制剂的后期研究提供实验基础。

**[关键词]** 雪上一枝蒿; 总生物碱; 微乳; 粒径; 伪三元相图; 雪上一枝蒿甲素

**[中图分类号]** R283.6; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0007-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230007

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151022.1422.050.html>

**[网络出版时间]** 2015-10-22 14:22

## Preparation and Quality Evaluation of Shortstalk Monkshood Root Total Alkaloids Microemulsion

WU Yu-mei<sup>1</sup>, CHEN Xiao-lan<sup>1\*</sup>, LIN Ya-ping<sup>2</sup>, LIU Wen<sup>1</sup>, TANG Hong-yan<sup>1</sup>, DAI Ya-jie<sup>1</sup> (1. School of Pharmacy, Guiyang University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 2. Food and Drug Administration of Guizhou Province, Guiyang 550003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare shortstalk monkshood root total alkaloids microemulsion. **Method:** Formulation of shortstalk monkshood root total alkaloids microemulsion was selected and prepared by pseudo-ternary phase diagram method with different oil phase, emulsifier and co-emulsifier, and preliminarily study its stability and physicochemical properties. HPLC was adopted to determine the content of bullatine A. **Result:** The best prescription was total alkaloids in *Aconitum brachypodum* of 2%, isopropyl myristate of 3.3%, polyoxyethylene castor oil ether 35 of 19.8%, absolute ethanol of 9.9%, water of 65.0%. The microemulsion was clear, transparent and spherical with particle size among 10-100 nm. Storage at 4 °C and 25 °C for six months is stable. The content of bullatine A was 2.28 mg·g<sup>-1</sup>. **Conclusion:** The optimized microemulsion formulation can achieve expected requirements. It can lay a foundation for further study of shortstalk monkshood root total alkaloids microemulsion.

**[Key words]** *Aconitum brachypodum*; total alkaloids; microemulsion; particle size; pseudo-ternary phase diagram; bullatine A

雪上一枝蒿性温, 味苦、辛, 有大毒, 功效祛风除湿、通利关节、消肿止痛。其生物碱类成分具有活血、镇痛、抗炎等药理作用<sup>[1-2]</sup>。但雪上一枝蒿的治

疗量与中毒量十分接近, 使用不当可能导致中毒、心律失常乃至休克等<sup>[3]</sup>。毒性中药采用经皮给药是中医外治法的一大特色, 较其他给药途径, 在治疗痛

**[收稿日期]** 20150505(011)

**[基金项目]** 国家自然科学基金地区基金项目(81260646); 贵州省科学技术基金项目(黔科合J字[2012]2066号); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(QZYY2011-58); 贵阳中医学院博士基金项目(ZYY2011005)

**[第一作者]** 吴玉梅, 在读硕士, 从事中药、民族药药物新制剂及新剂型研究, Tel:15285135654, E-mail:335910887@qq.com

**[通讯作者]** \*陈晓兰, 博士, 教授, 从事中药、民族药药物新制剂及新剂型研究, Tel:0851-5652704, E-mail:chenxiaolan76@126.com

风、类风湿性关节炎和风湿关节炎等疾病方面更具显著的疗效优势。雪上一枝蒿主要有效成分为生物碱类,经皮给药时,该类成分的透皮性能较差,处方中常加入大量促渗剂以增加其透过量,但可能导致剂量控制不准确及中毒等副作用。微乳作为载体透皮给药,与其他剂型相比具有独特优势,能提高药物的透皮能力,可在角质层和真皮形成药物储库,明显缓释药物,获得长时间高剂量的释放<sup>[4]</sup>,从而提高药物的生物利用度,达到增效减毒的目的。本研究雪上一枝蒿总生物碱微乳的处方工艺并对其进行质量评价,为该制剂的深入研究与开发提供参考。

## 1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), JEM-2100 型透射电子显微镜(日本电子株式会社), Zetasizer Nano ZS 型激光粒度测定仪(英国马尔文仪器有限公司), AE/240 型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。雪上一枝蒿甲素对照品(纯度 $\geq 98\%$ ,中国食品药品检定研究院,批号 110895-200404),雪上一枝蒿总生物碱(自制,纯度 60%),肉豆蔻酸异丙酯(IPM, Alfa Aesar 公司),辛酸癸酸三甘油酯(GTCC,英国禾大公司),聚山梨酯 80(tween-80,成都市科龙化工试剂厂),甲醇、乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。聚氧乙烯 35 蓖麻油(EL35),聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH40)和泊洛沙姆 188(P188)均购于德国 BASF 公司。雪上一枝蒿药材购自昆明市宇斯药业有限责任公司,经贵阳中医学院王祥培教授鉴定为毛茛科植物短柄乌头 *Aconitum brachypodum* 的干燥块根。

## 2 方法与结果

### 2.1 油相的选择

**2.1.1 油相乳化能力考察** 取玉米油,IPM,GTCC 各 0.6 g,置于 5 mL 离心管中,以 tween-80 为乳化剂,固定油相与乳化剂比例为 6:4,采用高速分散器于  $8\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  搅拌,使其充分混匀,加入水 2 mL,高速搅拌乳化 2 min,得乳白均一乳剂。取制备好的乳剂在  $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 20 min,观察分层现象。采用紫外分光光度法考察乳剂的稳定性,按  $K_E = (A_0 - A)/A_0$  测定乳剂的物理稳定性参数( $K_E$ )。式中  $A_0$  为原乳剂的稀释液在某一波长的吸光度, $A$  为原乳剂离心后离心管下层液经同倍稀释后在同一波长的吸光度。在相同条件下, $K_E$  越小,乳剂越稳定,检测波长 550 nm。结果玉米油和 GTCC 制备的乳剂经离心后均发生明显分层,以合成油相 IPM 制备的乳剂较稳定;采用玉米油,GTCC 及 IPM 制备的乳

剂的  $K_E$  分别为 17.9,10.1,8.9。表明由 GTCC 和 IPM 制备的乳液稳定性更好。

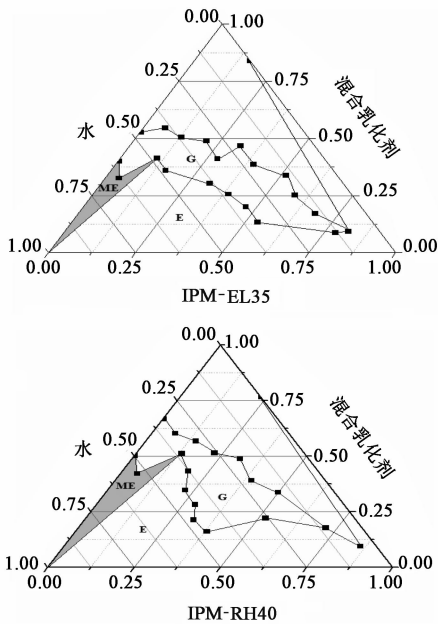
**2.1.2 不同油相对总生物碱溶解度的测定** 分别称取过量雪上一枝蒿总生物碱于西林瓶中,分别加入 IPM,GTCC 各 1 mL,于磁力搅拌器上室温搅拌 12 h,使溶解达平衡后,于  $1\ \text{万}\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清液,适当稀释后经  $0.45\ \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,取续滤液,测定雪上一枝蒿甲素的含量。结果显示总生物碱在 IPM 和 GTCC 中的平衡溶解度分别为  $2.40, 2.45\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,两者平衡溶解度相当。结合 2.1.1 项下乳化能力考察结果,故选择 IPM 作为微乳的油相。

### 2.2 乳化剂的选择

**2.2.1 乳化剂稳定性考察** 选择 IPM 为油相,以 EL35,RH40,P188 为乳化剂,固定油相与乳化剂质量比 6:4,乳化剂与油相进行混合后,恒温  $37\ ^\circ\text{C}$ ,  $350\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  搅拌,加 100 倍量水,从加水即刻计时,分别于 30,60,90,120,180,240 s 取样 2 mL,采用紫外分光光度法在 550 nm 处测定吸光度  $A$ ,考察乳化剂的乳化性能,结果发现 P188 会形成油水混合物,几乎不能乳化,不能测定  $A$ ;EL35,RH40 能形成乳白均一乳剂,以 EL35 的  $A$  最小,推测其形成的乳剂粒径最小,故选择这 2 种乳化剂进行微乳的相图研究。

**2.2.2 伪三元相图筛选乳化剂<sup>[5]</sup>** 精密称取 RH40,EL35 分别作为乳化剂,乙醇作为助乳化剂,乳化剂和助乳化剂按质量比 2:1 制备混合乳化剂,2 种混合乳化剂分别与 IPM 按质量比 9:1,8:2,7:3,6:4,5:5,4:6,3:7,2:8,1:9 的比例精确称量,置于西林瓶中, $25\ ^\circ\text{C}$  恒温水浴,于  $300\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  磁力搅拌混合均匀,加水滴定,观察液体的形态变化,同时以 600 nm 入射光照射,观察是否有丁达尔现象,记录体系的临界变化点。计算临界变化点时每个组分在微乳体系中的质量分数,用等边三角形的 1 个边表示乳化剂和助乳化剂的混合物(S),其余 2 个边分别表示油相和水相,借助 Origin 7.5 软件绘制微乳的伪三元相图,确定 O/W 型微乳区,见图 1。结果显示 RH40 所形成的微乳区最大,但 RH40 在温度较低时不易流动,且结合其稳定性考察项目的结果,故选用 EL35 为乳化剂。

**2.3 助乳化剂的选择** 精密称取 EL35 作为乳化剂,考察不同助表面活性剂(无水乙醇,1,2-丙二醇,异丙醇,丙三醇,乙醇与 1,2 丙二醇比例 1:1)对微乳体系的影响,固定乳化剂与助乳化剂质量比 2:1,按照 2.2.2 项下水滴定法操作,滴定过程中不断观

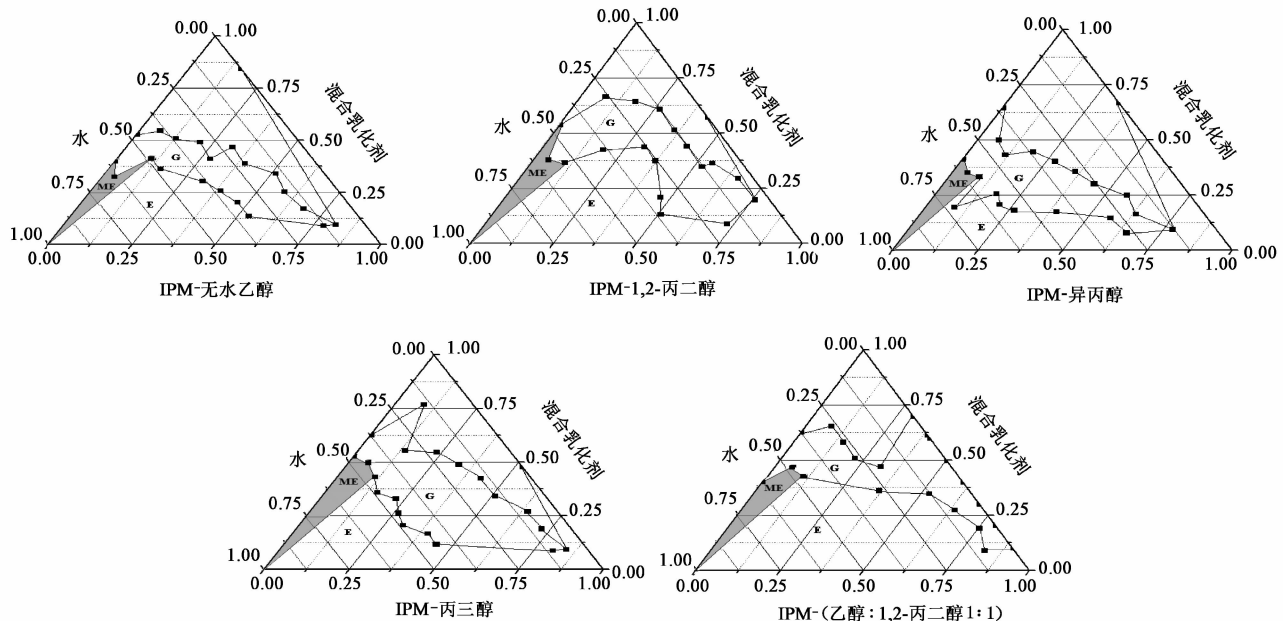


ME. O/W 型微乳区;G. 凝胶区;E. 普通乳剂区

图 1 不同乳化剂形成雪上一枝蒿总生物碱微乳的伪三元相

Fig.1 Pseudo-ternary phase diagrams of shortstalk monkshood root total alkaloids microemulsion formed by different emulsifiers

察体系变化和是否出现丁达尔现象,记录临界点并绘制伪三元相图,见图 2。结果显示丙三醇所形成的微乳区域面积最大,但所形成的微乳放置后有絮状物产生且凝胶区也较大。无水乙醇所形成的微乳区域面积较小,但其微乳稳定且凝胶区也小,故选用



ME. O/W 型微乳区;G. 凝胶区;E. 普通乳剂区

图 2 不同助乳化剂形成雪上一枝蒿总生物碱微乳的伪三元相

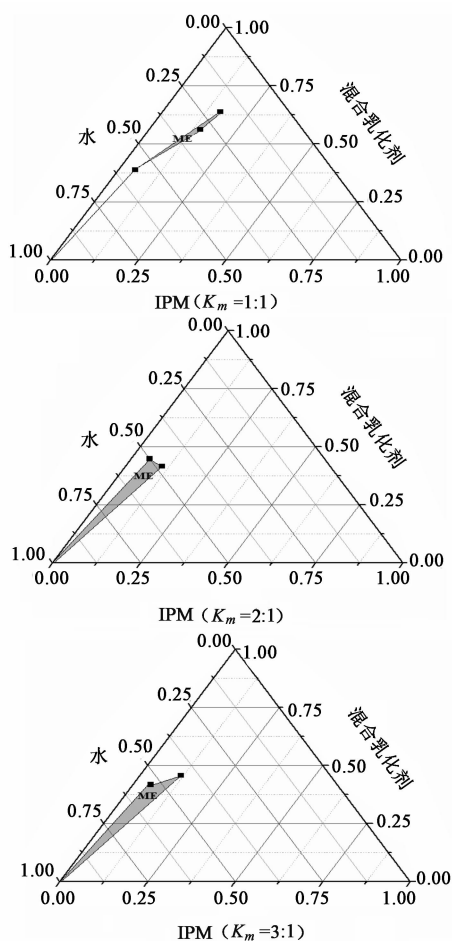
Fig.2 Pseudo-ternary phase diagrams of shortstalk monkshood root total alkaloids microemulsion formed by various co-emulsifier

无水乙醇为助乳化剂。

**2.4 乳化剂与助乳化剂的质量比( $K_m$ )对微乳形成的影响** 以 EL35 为乳化剂,无水乙醇为助乳化剂,二者  $K_m$  分别按 1:1,2:1,3:1 混合均匀,继而分别与 IPM 按质量比 9:1,8:2,7:3,6:4,5:5,4:6,3:7,2:8,1:9 混合均匀,按 2.2.2 项下水滴定法操作,滴定过程中不断观察体系变化和是否出现丁达尔现象,记录临界点并绘制伪三元相图,见图 3。结果显示当  $K_m$  为 2:1 和 3:1 时所形成的空白微乳区域面积较大,但  $K_m$  为 3:1 时,形成的微乳放置后会变混浊,不稳定,故选用  $K_m = 2:1$ 。混合乳化剂与 IPM 质量比为 9:1,8:2 时能形成微乳,但质量比为 8:2 所制备的微乳不稳定,故确定混合乳化剂与 IPM 质量比 9:1。

**2.5 空白微乳处方的确定** 由以上筛选结果确定 IPM 为油相,EL35 为乳化剂,无水乙醇为助乳化剂, $K_m = 2:1$ ,混合乳化剂与 IPM 质量比 9:1。微乳处方为 IPM-EL35-无水乙醇-水 (3.3% : 19.8% : 9.9% : 67.0%)。

**2.6 雪上一枝蒿微乳处方的确定** 称取适量雪上一枝蒿总生物碱,加入 IPM 中,按比例加入混合乳化剂,超声使分散溶解。将水相逐滴滴加到混合物中,搅拌直至形成透明的微乳系统。制备含雪上一枝蒿总生物碱 0.5%,1%,2% 的微乳,于 12 000  $r \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,测定离心前后微乳中雪上一枝蒿的含量变化。结果表明雪上一枝蒿微乳中雪上一



ME. O/W 型微乳区

图 3 不同乳化剂/助乳化剂的质量比所形成雪上一枝蒿总生物碱微乳的伪三元相

Fig. 3 Pseudo-ternary phase diagrams of shortstalk monkshood root total alkaloids microemulsion formed by different quality ratio of emulsifier to co-emulsifier

枝蒿甲素的含量在离心前后无明显变化。表明制备的雪上一枝蒿微乳稳定性良好。因此,确定雪上一枝蒿微乳处方为雪上一枝蒿总生物碱-IPM-EL35-无水乙醇-水(2.0% : 3.3% : 19.8% : 9.9% : 65.0%)。

## 2.7 质量评价

**2.7.1 微乳性状** 空白微乳为无色透明、低黏度液体;雪上一枝蒿总生物碱微乳为棕黄色透明、低黏度液体。空白微乳和雪上一枝蒿微乳用 650 nm 激光入射,两者都具有明显丁达尔现象。

**2.7.2 形态观察** 取 3 批雪上一枝蒿总生物碱微乳(批号 20150323, 20150325, 20150327) 适量,用水稀释 20 倍,滴在覆有支持膜的铜网上,静置 10 min 后用滤纸片吸干,滴加 2% 磷钨酸(pH 7.4)溶液于铜网上负染 3 min,自然挥干,采用透射电子显微镜观察并摄制照片,见图 4。结果显示该微乳多呈圆

球形,分散较好,且大小较均匀。

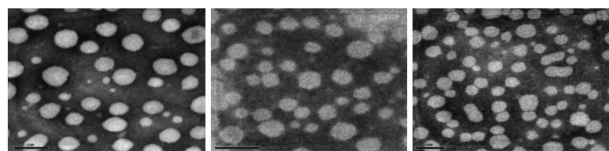


图 4 3 批雪上一枝蒿总生物碱微乳透射电镜( $\times 120\ 000$ )

Fig. 4 TEM of three batches of shortstalk monkshood root total alkaloids microemulsion ( $\times 120\ 000$ )

**2.7.3 粒径分布** 采用 Zetasizer Nano ZS 型激光粒度测定仪测定雪上一枝蒿总生物碱微乳的粒子大小及分布范围,结果显示 3 批样品的平均粒径分别为 18.41, 17.98, 19.70 nm, 多分散指数(PDI)分别为 0.196, 0.183, 0.221。PDI 反映颗粒粒径均一的程度,其值介于 0~1,数值越小,表示颗粒的单分散性越好,粒径分布越窄。

**2.7.4 微乳的鉴别** 取 3 批雪上一枝蒿总生物碱微乳,于  $4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min,结果 3 批样品都呈均一澄明状态,没有分层,可判断为已形成微乳。能被水稀释的微乳为 O/W 型微乳,能被大量油稀释的为 W/O 型微乳。取 3 批雪上一枝蒿总生物碱微乳适量,分别加水 and 油稀释,结果表明 3 批样品可被水稀释,而不能被油稀释,加入大量油后分层,故判断该微乳为 O/W 型微乳。

**2.7.5 pH 测定** 分别取 3 批微乳 0.5 g,加水稀释 100 倍,利用酸度计测定样品的平均 pH 5.92。

**2.7.6 微乳的稳定性** 参考 2010 年版《中国药典》二部附录,将雪上一枝蒿总生物碱微乳以  $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min,微乳澄清透明,无分层现象,符合微乳稳定性要求。采用留样观察法考察,取适量雪上一枝蒿总生物碱微乳,密封于试管内,分别放置于 4, 25  $^{\circ}\text{C}$  条件下贮藏 6 个月,定期进行观察,结果表明微乳透明度及雪上一枝蒿甲素含量均无明显变化。

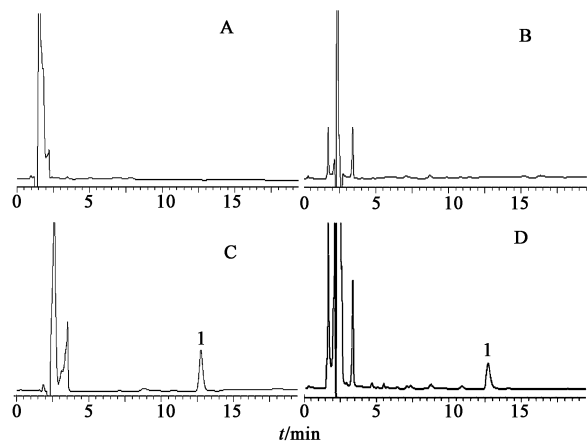
## 2.8 雪上一枝蒿甲素的含量测定<sup>[6-7]</sup>

**2.8.1 对照品溶液的制备** 精密称取雪上一枝蒿甲素对照品适量,加甲醇溶液溶解并制成  $1.004\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶液。

**2.8.2 供试品溶液的制备** 分别精密称取空白微乳与雪上一枝蒿总生物碱微乳 0.5 g 置于 10 mL 量瓶中,加入甲醇超声 10 min,取出,放至室温,加甲醇定容。精密移取 2 mL 于 25 mL 量瓶中,加入甲醇超声 5 min,取出,放至室温后,加甲醇稀释至刻度,摇匀,经  $0.45\ \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,收集续滤液,即得。

**2.8.3 色谱条件** Kromasil  $\text{C}_{18}$  色谱柱(4.6 mm  $\times$

150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相乙腈-磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.3) (20:80), 流速 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 检测波长 199 nm, 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 进样量 20  $\mu\text{L}$ 。见图 5。



A. 甲醇; B. 空白微乳; C. 对照品; D. 供试品; 1. 雪上一枝蒿甲素

图5 雪上一枝蒿总生物碱微乳 HPLC

Fig. 5 HPLC chromatograms of shortstalk monkshood root total alkaloids microemulsion

**2.8.4 标准曲线的制备** 精密吸取适量对照品溶液于量瓶中, 加甲醇分别制成质量浓度为 2.008, 4.016, 8.032, 12.048, 16.064, 20.08 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的系列对照品溶液。按 2.8.3 项下色谱条件测定。以雪上一枝蒿甲素质量浓度为横坐标, 峰面积积分为纵坐标, 得回归方程  $Y = 21.32X + 1.075$  ( $r = 0.9999$ ), 线性范围 2.008 ~ 20.08 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>。

**2.8.5 精密考察** 取 8.032 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 雪上一枝蒿甲素对照品溶液, 按 2.8.3 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算雪上一枝蒿甲素峰面积的 RSD 1.7%。

**2.8.6 稳定性考察** 取同一样品溶液, 按 2.8.3 项下色谱条件分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24 h 进样分析, 计算雪上一枝蒿甲素峰面积在 24 h 内的 RSD 1.9%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.8.7 重复性试验** 精密称取雪上一枝蒿总生物碱微乳 6 份, 按 2.8.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.8.3 项下色谱条件测定, 结果微乳中雪上一枝蒿甲素质量分数 2.19 mg  $\cdot$  g<sup>-1</sup>, 重复性的 RSD 1.5%。

**2.8.8 加样回收率考察** 精密称取已知雪上一枝蒿甲素含量的雪上一枝蒿微乳 6 份, 每份 0.25 g, 各加入雪上一枝蒿甲素对照品 0.502 mg, 按 2.8.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.8.3 项下色谱条件测定, 结果平均加样回收率 99.6%, RSD 2.7%。

**2.8.9 样品测定** 取 3 批雪上一枝蒿总生物碱微乳, 每批 3 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 按 2.8.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.8.3 项下色谱条件测

定, 结果雪上一枝蒿甲素的质量分数分别为 2.28, 2.23, 2.34 mg  $\cdot$  g<sup>-1</sup>。

### 3 讨论

雪上一枝蒿总生物碱有明确的祛风除湿、通利关节、消肿止痛等作用。目前, 雪上一枝蒿相关制剂的研究主要有片剂、涂膜剂、巴布剂等<sup>[8-10]</sup>, 但片剂存在口服吸收有首过效应, 涂膜剂载药量小、含有大量有机溶剂且不易储藏, 巴布剂透皮速率低、不适合大分子药物的透皮等缺点。由于微乳载药量大, 具有较好的透皮效果, 且可在角质层和真皮形成药物储库, 能明显起到缓释药物的作用。因此, 本文对雪上一枝蒿总生物碱微乳的处方进行研究并对其进行质量评价, 对该制剂的进一步开发具有重要意义。

本文通过平衡溶解度选择了适宜的油相, 采用伪三元相图法优化了表面活性剂、助表面活性剂的种类及其各自在处方中的比例。采用优选的处方所制备的雪上一枝蒿总生物碱微乳外观澄清透明, 粒径在 10 ~ 100 nm, 稳定性好。

#### [参考文献]

- [1] 高邵阳, 喻萍, 陈武元, 等. RP-HPLC 法测定雪上一枝蒿中雪上一枝蒿甲素含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(11): 1382-1384.
- [2] 朱任宏, 方圣鼎, 黄伟光. 中国乌头之研究 V. 雪上一枝蒿中的生物碱[J]. 化学学报, 1964, 30(2): 139-145.
- [3] 罗亮丞. 雪上一枝蒿对心脏毒性的临床探讨[J]. 中医杂志, 1980, 21(9): 37-39.
- [4] Dalmora M E, Dalmora S L, Oliveira A G. Inclusion complex of piroxicam with  $\beta$ -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. *In vitro* drug release and *in vivo* topical anti-inflammatory effect[J]. Int J Pharm, 2001, 222(1): 45-55.
- [5] 潘国梁, 贾晓斌, 魏惠华, 等. 药用微乳伪三元相图的几种制备方法比较研究[J]. 中国药房, 2006, 17(1): 21-23.
- [6] 陈晓兰, 吴玉梅, 林亚平, 等. HPLC 法测定雪上一枝蒿中雪上一枝蒿甲素含量方法的改进[J]. 现代妇女: 医学前沿, 2014(1): 49-51.
- [7] 邹大江, 黄先菊, 高瑞希, 等. HPLC 测定雪上一枝蒿中 3 种生物碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(8): 41-43.
- [8] 张红宇, 王璐. 雪上一枝蒿片的药效学研究[J]. 中华临床医学杂志, 2005, 6(3): 3-4.
- [9] 赵颖, 林亚平, 靳风云, 等. 雪上一枝蒿控释涂膜剂的制备研究[J]. 中草药, 2008, 39(12): 1807-1810.
- [10] 赵颖, 林亚平. 雪上一枝蒿巴布剂的体外释放实验研究[J]. 中成药, 2006, 28(11): 1663-1665.

[责任编辑 刘德文]